

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21775 A1

(51) 国際特許分類:
15/55, C12P 21/02, 21/08, C07K 16/40

C12N 9/20,

(74) 代理人: 山内秀晃, 外(YAMAUCHI, Hideaki et al.);
〒553-0002 大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩
野義製薬株式会社 知的財産部 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06344

(22) 国際出願日: 2000 年 9 月 18 日 (18.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/266616 1999 年 9 月 21 日 (21.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 塩野義
製薬株式会社 (SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
541-0045 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号
Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 石崎 順
(ISHIZAKI, Jun) [JP/JP]. 鈴木紀子 (SUZUKI, Noriko)
[JP/JP]. 花崎 浩二 (HANASAKI, Kohji) [JP/JP]; 〒
553-0002 大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩
野義製薬株式会社内 Osaka (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE ENCODING NOVEL HUMAN SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂

(54) 発明の名称: 新規ヒト分泌型ホスホリパーゼ A₂ をコードする遺伝子

(57) Abstract: A gene encoding human secretory phospholipase A₂ (PLA₂). An expression vector having the above gene and a transformant carrying this expression vector transferred therein are also obtained. By culturing the transformant, the above-described PLA₂ protein can be produced.

(57) 要約:

本発明は、ヒト分泌型ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) タンパク質をコードする遺
伝子に関する。本発明によれば、該遺伝子を有する発現ベクター、および該発現
ベクターを導入した形質転換体を得られ、該形質転換体を培養することにより本
発明の PLA₂ タンパク質が産生される。

WO 01/21775 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明細書

新規ヒト分泌型ホスホリパーゼA₂をコードする遺伝子

5 技術分野

本発明は、ヒト分泌型ホスホリパーゼA₁；本発明タンパク質をコードするDNA；本発明DNAを含む発現ベクター；本発明発現ベクターを有する形質転換体；本発明形質転換体を用いたヒト分泌型ホスホリパーゼA₁の製造方法；本発明タンパク質を特異的に認識する抗体；本発明タンパク質を用いた化合物のスクリーニング方法；本発明のスクリーニング方法により得られた化合物に関する。

背景技術

ホスホリパーゼA₁ (PLA₁; EC 3.1.1.4) は、3-sn-ホスホグリセリドの2-アシルエステル結合を加水分解するリン脂質分解酵素の総称である。PLA₁は、食物中のリン脂質消化や生体膜リン脂質の新生と代謝などに関わるとともに、プロスタグランジンなどの脂質メディエーター産生にいたるアラキドン酸カスケードの開始酵素として機能する。哺乳動物では多様なPLA₁の存在が明らかになっており、その局在性、カルシウムイオン (Ca²⁺) 要求性、基質特異性に基づいて、分泌型PLA₁、細胞質型PLA₁、Ca²⁺非依存型PLA₁、ならびにPlatelet-Activating Factor-アセチルヒドロラーゼの4つのファミリーに分類されている (Balsindeら、J. Biol. Chem. 272, 16069-16072 (1997))。

このうち分泌型PLA₁ファミリーは、細胞外に分泌される低分子量 (13,000 ~ 15,000) のPLA₁分子群であり、IB型、IIA型、IID型、IIC型、V型、ならびにX型の6種類が知られている。いずれの分子種も、その構造中に12~16個のCys残基を持ち、分子内ジスルフィド結合を形成しており、またHis-Asp残基からなる活性中心部位が保存されている。さらに、共通のCa²⁺結合領域を持ち、酵素活性の発現に

はmMオーダーの Ca^{2+} を要求する (Tischfieldら、J. Biol. Chem. 272, 17247-17250 (1997)、Cupillardら、J. Biol. Chem. 272, 15745-15752 (1997)、およびIshizakiら、J. Biol. Chem. 274, 24973-24979 (1999))。

- IB型は、膵臓等で消化酵素として機能するほか、その特異的なレセプターへの結合を介してエンドトキシンショックなどの炎症病態の形成に関与していると考えられている。一方、IIA型は、血小板や滑膜細胞などに存在し、炎症性サイトカインの刺激で発現が増強されることから、種々の炎症反応に関与していると考えられている。しかしながら、IIA型を遺伝的に欠損しているマウス種でも炎症反応は通常どおり起こることから、その病態生理学上の意義に疑問が提示されている。
- 10 V型は、心臓とともに炎症系細胞に発現している。またX型は、脾臓、胸腺など免疫系の組織に発現している。両者とも生体防御や炎症反応への関与が示唆されているが、その生体内での重要性については十分明らかにされていない (花崎ら、細胞工学、17, 694-701 (1998))。

15 発明の開示

- 本発明の目的は、新規ヒト分泌型ホスホリパーゼ A_2 ；本発明タンパク質をコードするDNA；本発明DNAを含む発現ベクター；本発明発現ベクターを有する形質転換体；本発明形質転換体を用いたヒト分泌型ホスホリパーゼ A_2 の製造方法；本発明タンパク質を特異的に認識する抗体；本発明タンパク質を用いた化合物のスクリーニング方法；本発明のスクリーニング方法により得られた化合物を提供することにある。
- 20

- 本発明者らは、マウスX型PLA $_2$ の生理機能の解明を目指して鋭意研鑽を重ねてきたが、その過程で、Expressed Sequence Tags (EST) データベースの遺伝子配列中に、マウスX型PLA $_2$ と相同性のある部分配列を見出し、その配列を基に、マウス脾臓cDNAライブラリーより新規分泌型PLA $_2$ タンパク質をコードするDNA配列
- 25

を見出した。さらにこの塩基配列を基にしてヒト小腸cDNAライブラリーよりヒト分泌型PLA₂タンパク質（IIE型）をコードするDNA配列を見出し、本発明を完成するに至った。

5 すなわち、本発明は、

（１）配列番号３０の１位のAsnから１２３位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質；

（２）配列番号３０の－１９位のMetから１２３位のCysまでのアミノ酸配列を含む上記（１）記載のタンパク質；

10 （３）上記（１）または（２）に記載のアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含み、かつホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質；

（４）上記（１）、（２）または（３）のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA；

15 （５）配列番号２９の１１６位のAから４８４位のCまでの塩基配列を含む上記（４）記載のDNA；

（６）配列番号２９の５９位のAから４８４位のCまでの塩基配列を含む上記（５）記載のDNA；

20 （７）上記（５）または（６）に記載のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、ホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質をコードするDNA；

（８）上記（４）から（７）のいずれかに記載のDNAを有する発現ベクター；

（９）上記（８）記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体；

（１０）宿主が哺乳類細胞株である上記（９）記載の形質転換体。

25 （１１）上記（９）または（１０）に記載の形質転換体を培養する工程、および產生された上記（１）、（２）または（３）のいずれかに記載のタンパク質を培養培地から回収する工程を包含する、該タンパク質の製造方法；

(12) 上記(1)、(2)または(3)のいずれかに記載のタンパク質を特異的に認識する抗体；

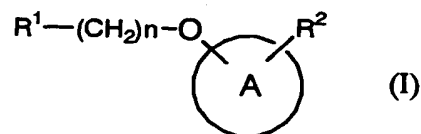
(13) 上記(12)に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼA₂関連疾患の診断薬；

5 (14) 上記(12)に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼA₂の測定キット；

(15) 上記(12)に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼA₂関連疾患の治療薬；

(16) 上記(1)、(2)または(3)のいずれかに記載のタンパク質を用いた、ホスホリパーゼA₂活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法；
および

(17) 上記(16)に記載のスクリーニング方法より得られる一般式(I)



(式中、

15 A環は、置換されていてもよい炭素環、又は置換されていてもよい複素環；

R¹は、-COOH、-SO₃H、又は-PO(OH)₂；

R²は、-COCONH₂、-CH₂CONH₂、又は-CH₂CONHNH₂；

nは、0～6の整数)

で示される化合物を有効成分とするIIE型ホスホリパーゼA₂阻害剤；および

20 (18) IIE型ホスホリパーゼA₂が上記(1)から(3)のいずれかに記載のタンパク質である上記(17)記載の阻害剤、に関する。

本発明のタンパク質は、「配列番号30の1位Asnから123位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」であり、「配列番号30の-19位のMetから1

2 3 位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」も包含する。「配列番号 3 0
の 1 位Asnから 1 2 3 位のCysまでのアミノ酸配列を含むタンパク質」は、分泌型
PLA₂の成熟タンパク質であり、「配列番号 3 0 の - 1 9 位のMetから 1 2 3 位のCys
までのアミノ酸配列を含むタンパク質」は、シグナルペプチドを含む未成熟なタ
5 ンパク質である。または本発明のタンパク質には「該アミノ酸配列において 1 も
しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含み、
かつホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質」を含む。「アミノ酸の置換、欠
失、挿入又は付加」の程度及びそれらの位置等は、改変されたタンパク質が、配
列番号 3 0 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質と同様にホスホリパーゼ
10 A₂活性を有するタンパク質であれば特に制限されない。本発明において「ホスホ
リパーゼA₂活性」とは、「3-sn-ホスホグリセリドの2-アシルエステル結合をCa²⁺
依存的に加水分解するリン脂質分解活性」を意味する。

なお、これらアミノ酸配列の変異等は、天然において、例えば突然変異や翻訳
後の修飾等により生じる場合もあるが、本発明DNAに基づいて人為的に改変する
15 こともできる。本発明のタンパク質は、このような改変・変異の原因・手段を等
を問わず、上記特性を有する全ての改変DNAによりコードされるタンパク質を含
む。

本発明のDNAとは、「本発明のタンパク質をコードするDNA」を指す。本発
20 明のDNAとして、好ましくは、本発明の成熟タンパク質をコードする配列番号 2
9 の 1 1 6 位のAから 4 8 4 位のCまでの塩基配列を含むDNAが例示される。また、
本発明の未成熟なタンパク質をコードする配列番号 2 9 の 5 9 位のAから 4 8 4
位のCまでの塩基配列を含むDNAが例示される。本発明のDNAとストリンジेंटな
条件でハイブリダイズし、かつホスホリパーゼA₂活性を有するタンパク質をコー
25 ドするDNAも、本発明のDNAに含まれる。「DNAにストリンジेंटな条件でハイブ
リダイズするDNA」は、コード領域のDNAをプローブとして用いることにより得る

ことが出来る。ここで、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」とは、例えば、 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ および $50\% \text{ホルムアミド}$ の溶液中で 42°C にて加温した後、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ の溶液中で 68°C にて洗浄する条件でも依然として陽性のハイブリダイズのシグナルが観察されることを表す。

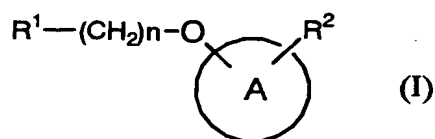
5

本発明のDNAを用いて、組換えタンパク質を生産するには、例えば、Molecular Cloning等の多くの教科書や文献に基づいて実施することができる。具体的には、発現させたいDNAの上流に翻訳開始コドンが付加し、下流には翻訳終止コドンが付加する。さらに、転写を制御するプロモーター配列（例えば、trp、lac、T7、SV40
10 初期プロモーター）等の制御遺伝子を付加し、適当なベクター（例えば、pBR322、pUC19、pSV・SPORT1など）に組み込むことに、宿主細胞内で複製し、機能する発現プラスミドを作製する。

次に、発現プラスミドを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、哺乳
15 乳類などの多細胞生物の細胞などが挙げられる。好ましくは、哺乳類の細胞であり、哺乳類の細胞としては、CHO細胞、293細胞、COS-7細胞などが例示できる。

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドまたはエпитープを構成しうるペプチド断片に対する抗体であり、モノクローナル抗体とポリクローナル抗体のいずれをも含む。分泌型 PLA_2 は、脂肪酸（例えば、アラキドン酸）の放出に関与して
20 いる。過剰な脂肪酸の放出は、敗血症ショック、成人呼吸困難症候群、肺炎、外傷、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ等の疾病の原因となる。従って、分泌型 PLA_2 の濃度を測定することで、これら疾患の診断が可能となる。本発明の抗体は、分泌型ホスホリパーゼ A_2 関連疾患の診断薬及び測定キットを提供する。また、本発明の抗体が PLA_2 の活性を阻害する場合、抗体自身が PLA_2 に起
25 因する疾患の治療薬となる。

本発明は、本発明のスクリーニング方法より得られる化合物を有効成分とする IIE 型ホスホリパーゼ A₂ 阻害剤に関する。該化合物は、下記一般式 (I) で示す構造的特徴を有する。



5 (式中、

A 環は、置換されていてもよい炭素環、又は置換されていてもよい複素環；

R¹は、-COOH、-SO₃H、又は-PO(OH)₂；

R²は、-COCONH₂、-CH₂CONH₂、又は-CH₂CONHNH₂；

n は、0～6 の整数)

10 で示される化合物。

本明細書中、「炭素環」とは、飽和または不飽和であって、置換されたまたは置換されていない、環を形成している原子が水素原子以外は炭素原子のみである 5～14 員環、好ましくは、5～10 員環、さらに好ましくは 5～7 員環の有機骨格を意味する。上記の炭素環が 2～3 個連続しているものも包含する。代表的な炭素環としては、シクロアルカン（例えば、シクロプロパン、シクロブタン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタン、およびシクロオクタン）、シクロアルケン（シクロブテン、シクロペンテン、シクロヘキセン、シクロヘプテン、およびシクロオプテン）、ベンゼン、ナフタレン、インデン、フェナントレン、アントラセンなどが挙げられる。

20 本明細書中、「複素環」とは、単環式または多環式であって、飽和または不飽和であり、窒素原子、酸素原子、硫黄原子からなる群から選択される 1～3 のヘテロ原子を含む 5～14 の環原子を有する、置換されたまたは置換されていない複素環骨格を意味する。例えば、チオフェン、チアントレン、フラン、ピラン、ベンゾフラン、イソベンゾフラン、クロメン、キサンテン、フェノキサチン、

ピロール、イミダゾール、ピラゾール、チアゾール、イソチアゾール、オキサゾール、イソキサゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、トリアジン、インドリジン、イソインドール、インドール、インダゾール、プリン、キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、
5 キナゾリン、シンノリン、プテリジン、カルバゾール、フェナントリジン、アクリジン、ペリミジン、フェナジン、フェノチアジン、フェノキサジン、ピロロ[1, 2-a]ピラジン、ピロロ[1, 2-b]ピリダジン、ピロロトリアジン等が挙げられる。

「置換されていてもよい炭素環」、「置換されていてもよい複素環」における
10 置換基としては、アルキル、ハロアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキル、カルボキシ、ハロゲン (F、Cl、Br、I)、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、メルカプト、チオホルミル、チオアセチル、チオカルボキシ、ジチオカルボキシ、チオカルバモイル、スルフィノ、スルフォ、スルファモイル、スルホアミノ、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいア
15 ラルキル、置換されていてもよいヘテロアリール、置換されていてもよいヘテロアリールアルキルなどが基が挙げられる。それらの置換基は、上記炭素環および複素環の環構成原子上の置換可能な任意の1～4個の位置にて置換することができる。

「アルキル」とは、直鎖状もしくは分枝鎖状のC1～C8のアルキルまたはC
20 3～C8の環状アルキルを意味する。例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、n-ヘキシル、n-ヘプチル、n-オクチル、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル等が挙げられる。

「ハロアルキル」とは、1個またはそれ以上のハロゲンで置換された直鎖状もしくは分枝鎖状のC1～C8のハロアルキルまたはC3～C8の環状ハロアルキ
25 ルを意味する。例えば、クロロメチル、フルオロメチル、トリフルオロメチル、

2, 2, 2-トリフルオロエチル、1, 1-ジフルオロエチル、トリクロロメチル、2, 2, 2-トリクロロエチル、1, 1-ジクロロエチル等が挙げられる。

「アルケニル」とは、1個またはそれ以上の二重結合を有する、直鎖状もしくは分枝鎖状のC2～C8のアルケニルまたはC3～C8の環状アルケニルを意味する。例えば、ビニル、1-プロベニル、2-プロベニル、イソプロベニル、2-シクロブテン-1-イル、2-シクロペンテン-1-イル、3-シクロペンテン-1-イル、2-シクロヘキセン-1-イル等が挙げられる。

「アルキニル」とは、1個またはそれ以上の三重結合を有する、直鎖状もしくは分枝鎖状のC2～C8のアルキニルまたはC3～C8の環状アルキニルを意味する。例えば、エチニル、1-プロピニル、2-プロピニル、1-ブチニル、2-ブチニル、3-ブチニル等が挙げられる。

「ハロゲン」とは、フッ素、塩素、臭素、沃素を意味する。

「アリール」とは、C6～C14の芳香族単環または芳香族縮合環を意味し、例えば、フェニル、ナフチル（例えば、1-ナフチル、2-ナフチル）、アントリル（例えば、1-アントリル、2-アントリル、9-アントリル）等が挙げられる。

「アラルキル」とは、前記「アルキル」に前記「アリール」が1または2以上置換したものを包含し、これらは可能な全ての位置で置換しうる。例えば、ベンジル、フェニルエチル（例えば、2-フェニルエチル等）、フェニルプロピル（例えば、3-フェニルプロピル等）、ナフチルメチル（例えば、1-ナフチルメチル、2-ナフチルメチル等）、アントリルメチル（例えば、9-アントリルメチル等）等が挙げられる。好ましくは、ベンジル、フェニルエチルが挙げられる。

「ヘテロアリール」とは、任意に選ばれる、酸素原子、硫黄原子又は窒素原子を環内に1個以上含む5～6員の芳香環を包含する。

「ヘテロアリールアルキル」とは、前記「アルキル」の任意の位置に前記「ヘテロアリール」が1または2以上置換したものを包含し、これらは可能な全ての

位置で置換しうる。例えば、チエニルメチル（例えば、2-チエニルメチル）、チエニルエチル（例えば、2-（チオフエン-2-イル）エチル）、フリルメチル（例えば、2-フリルメチル）、フリルエチル（例えば2-（フラン-2-イル）エチル）、ピロリルメチル（例えば、2-ピロリルメチル）、ピロリルエチル（例えば、2-（ピロール-2-イル）エチル）、イミダゾリルメチル（例えば、2-イミダゾリルメチル、4-イミダゾリルメチル）、イミダゾリルエチル（例えば、2-（イミダゾール-2-イル）エチル）、ピラゾリルメチル（例えば、3-ピラゾリルメチル）、ピラゾリルエチル（例えば、2-（ピラゾール-3-イル）エチル）、チアゾリルメチル（例えば、2-チアゾリルメチル）、チアゾリルエチル（例えば、2-（チアゾール-2-イル）エチル）、イソチアゾリルメチル（例えば、3-イソチアゾリルメチル）、イソキサゾリルメチル（例えば、3-イソキサゾリルメチル）、オキサゾリルメチル（例えば、2-オキサゾリルメチル）、オキサゾリルエチル（例えば、2-（オキサゾール-2-イル）エチル）、ピリジルメチル（例えば、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、4-ピリジルメチル）、ピリジルエチル（例えば、2-ピリジルエチル）等が挙げられる。

「置換されていてもよいアリール」、「置換されていてもよいアラルキル」、「置換されていてもよいヘテロアリール」および「置換されていてもよいヘテロアリールアルキル」における置換基としては、アルキル、ハロアルキル、アルケニル、アルキニル、アルキル、カルボキシ、ハロゲン（F、Cl、Br、I）、ヒドロキシアルキル、ヒドロキシ、ニトロ、シアノ、メルカプト、チオホルミル、チオアセチル、チオカルボキシ、ジチオカルボキシ、チオカルバモイル、スルフィノ、スルフォ、スルファモイル、スルホアミノ等が挙げられる。

25 図面の簡単な説明

図1は、配列番号2、3、4および5のオリゴマーの相対的な位置関係を示す

略図である。

図 2 は、本発明のヒト PLA₁ をコードする遺伝子を有する形質転換体と、PLA₁ を有さない形質転換体の細胞内 (Lysate) と細胞上清中 (Supernatant) の PLA₁ 活性を示す図である。

- 5 図 3 は、本発明のヒト分泌型 PLA₁ をコードする遺伝子を有する形質転換体の培養上清中の PLA₁ 活性の Ca²⁺ 依存性を示す図である。

図 4 は、Indoxam による本発明分泌型 PLA₂ を含む分泌型 PLA₂ の阻害活性を示す図である。

10 発明を実施するための最良の形態

本発明は、おもに新規ヒト分泌型ホスホリパーゼ A₁ に関する。

- 以下に本発明タンパク質の調製工程、抗体の調製工程、本発明タンパク質を用いた、ホスホリパーゼ A₁ 活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法を説明する。本明細書において、特に指示のない限り、当該分野で公知である遺伝子組換え技術、動物細胞、昆虫細胞、酵母および大腸菌での組換えタンパク質の生産技術、発現したタンパク質の分離精製法、分析法および免疫学的手法が採用される。
- 15

本発明分泌型 PLA₁ をコードする DNA 配列

- 20 本発明の DNA は本発明により教示された配列情報に基づいて一般的遺伝子工学的手法により容易に製造・取得することができる (Molecular Cloning 2d Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989) 等参照)。具体的には本発明 DNA が発現される適当な起源より、常法に従って cDNA ライブラリーを調製し、該ライブラリーから本発明 DNA に特有の適当なプローブや抗体を用いて所望のクローンを選択すること
- 25 により実施できる (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 22, 778 (1983) 等参照)。cDNA の起源としては、本発明の DNA を発現する各種の細胞、

組織やこれらに由来する培養細胞等が例示される。これらからの全RNAの分離、mRNAの分離・精製、cDNAの取得とそのクローニング等はいずれも常法に従い実施できる。また、cDNAライブラリーは市販されており、本発明においてはそれらcDNAライブラリー、例えばClontech社より市販の各種cDNAライブラリー等を用いることもできる。

本発明のDNAをcDNAライブラリーからスクリーニングする方法も、特に限定されず、通常の方法に従うことができる。具体的には、例えばcDNAによって産生されるタンパク質に対して、該タンパク質特異的抗体を使用した免疫的スクリーニングにより対応するcDNAクローンを選択する方法、目的のDNA配列に選択的に結合するプローブを用いたブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等やこれらの組み合わせ等を例示できる。ここで用いられるプローブとしては、本発明DNAの塩基配列に関する情報をもとに化学合成されたDNA等が一般的に例示できるが、勿論既に取得された本発明DNAそのものや断片も良好に利用できる。また、本発明DNAの塩基配列情報に基づき設定したセンス・プライマー、アンチセンス・プライマーをスクリーニング用プローブとして用いることもできる。

本発明DNAの取得に際しては、PCR法(Science, 230, 1350 (1985))によるDNA/RNA増幅法も好適に利用できる。ライブラリーから全長cDNAが得られにくい場合には、RACE法(Rapid amplification of cDNA ends; 実験医学, 12(6), 35 (1988))等の採用が好適である。かかるPCR法の採用に際して使用されるプライマーは、既に本発明により明らかにされた本発明DNAの配列情報に基づいて適宜設定できる。このようなプライマーは、常法に従い合成できる。なお、増幅させたDNA/RNA断片の単離・精製は、前記のとおり常法に従い行なうことができる。例えば、ゲル電気泳動法等により行なうことができる。また、上記で得られる本発明DNAあるいは各種断片は、常法、例えばジデオキシ法(Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463

(1977))やマキシムーギルバート法(Methods in Enzymology, 65, 499 (1980))等に従って、また簡便には市販のシーケンスキット等を用いて、その塩基配列を決定することができる。

以下、本発明におけるDNAのクローニング方法につき説明する。

5

(1) マウス分泌型PLA₁をコードするDNAの配列決定

まず始めに、本発明のヒト分泌型PLA₁に対応するマウス分泌型PLA₁をコードするDNA断片の配列決定方法を以下に例示する。マウスX型PLA₁と相同性を示す配列をESTデータベースから見出し、その配列に対してプライマーを作製し、マウス
10 脾臓由来のcDNAライブラリー等を鋳型としてPCR(Polymerase Chain Reaction)を行う。得られたDNA断片をDNAシーケンシングにより分析することにより、マウス分泌型PLA₁をコードするDNA断片が決定され得る。

(A) 新規 PLA₁ cDNA 断片の単離とマウス組織での発現パターンの解析

15 DNA断片が由来する遺伝子と、その遺伝子がコードするタンパク質の機能を解析するためには、この断片から5'側および3'側につながる未同定のcDNAを単離し、同時にこの断片自身の配列を再確認する必要がある。そのためには、まず、その遺伝子の発現量の多い組織を材料に用いることが実験操作上有利である。

20 組織における発現の有無ならびに組織間での相対発現量は、各組織から抽出したmRNAを固定したシートを放射標識したDNA断片(プローブ)とハイブリダイゼーションすることによって確認することができる(ノザン解析)。マウス各組織における発現量をノザン解析によって比較するためには、プローブとして用いるPLA₁ cDNA断片を得る必要がある。このような断片は、例えば、ESTデータベース
25 の塩基配列を基に作製したプライマーから、マウス組織由来のcDNA試料を鋳型とするPCRによって単離することが可能である。得られたcDNA断片(配列番号1)

をプローブとしたノザン解析を行なった。その結果、該遺伝子は、マウス心臓に多く発現していることが判明した。

(B) マウス分泌型 PLA_2 をコードする全長 cDNA の単離

- 5 cDNAの既知部分(中央部)の情報から、cDNAの5'端3'端を含む上流下流部分の配列は、例えば、あらかじめ5'端3'端にある特定の配列からなるアダプターDNAが付加されているcDNA試料を鋳型にして、この特定の配列に対応するオリゴマーと PLA_2 cDNA断片に特異的なオリゴマーのペアでPCRを行うことによって得ることができる(Rapid Amplification of cDNA End: RACE法)。cDNA試料として、マウス脾臓由来のMarathon-ready cDNA(Clontech社)を用いた。配列表の
- 10 配列番号14と配列番号15に、このようにして得られたマウス分泌型 PLA_2 タンパク質遺伝子を有するDNAの配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。
- 15 (C) ヒト分泌型 PLA_2 をコードする全長cDNAの単離
- 一般的に、マウスとヒトでは同じタイプの遺伝子の配列は互いに高い相同性を持つと期待できる。また、これまでにその構造が知られている様々な動物種由来の PLA_2 で必ず保存されているアミノ酸残基(コンセンサス配列)は、新規 PLA_2 においても保持されていると予想される。従って、コンセンサス配列に対応する
- 20 cDNA配列はヒト型 PLA_2 のcDNA配列とも特に相同性が高く、マウス PLA_2 遺伝子の配列情報をもとにヒトの相同遺伝子をクローニングする場合に利用価値がもっとも高い領域と考えられる。さらに、本発明のマウスのcDNA配列は、IIA型、IID型との相同性が高いことが判明したので、本発明のヒト分泌型 PLA_2 遺伝子もIIA型、IID型との相同性が高いと予測できる。以上の仮定のもとに、これらの PLA_2
- 25 に保存されているコンセンサス配列を基にしてオリゴマーを設計し、ヒト Genomic DNA (BOEHRINGER MANNHEIM) を鋳型としたPCRを行って、対応するヒト

分泌型 PLA₂ の部分配列をクローニングした。このヒト PLA₂ cDNA 中央部の情報から、cDNA の 5' 端 3' 端を含む上流下流部分の配列は、例えば、あらかじめ 5' 端 3' 端にある特定の配列からなるアダプター DNA が付加されている cDNA 試料を鋳型にして、この特定の配列に対応するオリゴマーと PLA₂ cDNA 断片に特異的なオリゴマーのペアで PCR を行うことによって得ることができる (上記 RACE 法)。

あるいは、相同性が高いと予想できるマウス PLA₂ cDNA の塩基配列情報よりヒト cDNA ライブラリーを鋳型とした PCR を行うことによって得ることができる。cDNA 試料としては、発現量の多いと予想されるヒト小腸由来の Marathon-ready cDNA を用いた。配列表の配列番号 29 と配列番号 30 に、このようにして得られたヒト分泌型 PLA₂ タンパク質遺伝子を有する DNA の配列とそれによってコードされるアミノ酸配列を示す。

本発明タンパク質の調製

(1) 組換え型 PLA₂ タンパク質の発現

本発明のタンパク質は、本発明の DNA 配列情報に従って、遺伝子工学的手法 (Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 5990 (1983) 等) により、組換えタンパク質として得ることができる。より詳細には、所望のタンパク質をコードする遺伝子を適当なベクターに組み込む。このベクターを宿主細胞に導入して形質転換体を作成する。該形質転換体を培養することにより組換えタンパク質を得ることができる。

ここで宿主細胞としては、真核生物及び原核生物のいずれも用いることができる。該真核生物の細胞には、脊椎動物、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞である COS 細胞 (Cell, 23, 175 (1981)) やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞等がよく利用される。

発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモ

- ーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用でき、これは更に必要により複製起点を有していても良い。該発現ベクターの例としては、例えば、SV40 の初期プロモーターを保有する pSV2dhfr(Mol. Cell. Biol., 1, 854 (1981))等を例示できる。また、真核微生物
- 5 としては、酵母が一般によく用いられ、中でもサッカロミセス属酵母を利用できる。該酵母の発現ベクターとしては、例えば酸性ホスファターゼ遺伝子に対するプロモーターを有する pAM82(Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 80, 1 (1983))等を利用できる。
- 10 原核生物の宿主としては、大腸菌や枯草菌が一般によく利用される。これらを宿主とする場合、例えば該宿主菌中で複製が可能なプラスミドベクターを用い、このベクター中に所望の遺伝子が発現できるように該遺伝子の upstream にプロモーター及び SD 配列、更に蛋白合成開始に必要な開始コドンが付与した発現プラスミドを利用するのが好ましい。上記宿主としては、E. coli K12 株等が利用される。
- 15 ベクターとしては一般に pBR322 及びその改良ベクターがよく利用されるが、これらに限定されず公知の各種の菌株及びベクターも利用できる。プロモーターとしては、例えば trp プロモーター、lpp プロモーター、lac プロモーター、PL/PR プロモーター等を使用できる。
- 20 所望の組換え DNA の宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また得られる形質転換体は、常法に従い培養でき、該培養により所望のタンパク質が産生される。該培養に用いられる培地としては、宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択利用でき、その培養も宿主細胞に適した条件下で実施できる。例えば、pSVL SV40 後期プロモーターの下流に本発明のヒト分泌型 PLA₂ 遺伝子を含むベクターを、サル由来細胞
- 25 COS-7 に導入することによって形質転換体を作成し、この形質転換体を 5% CO₂ 存

在下、37°Cで3日間培養することにより、組換え分泌型 PLA₁ タンパク質が産生され得る。

組換えタンパク質は、その物理的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作(Biochemistry, 25(25), 8274 (1986); Eur. J. Biochem., 163, 313 (1987)等)により分離・精製できる。該方法としては、塩析法、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外濾過、ゲル濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組み合わせ等を例示できる。

(2) 変異体の作製

アミノ酸配列は、任意のアミノ酸配列を欠失させ、所望のアミノ酸、ないしはアミノ酸配列を導入することによって置換される。アミノ酸配列の置換処理には、プロテインエンジニアリングとして知られる方法が広く利用できるが、例えば、Site-directed deletion (部位指定削除) 法 (Nucl. Acids Res., 11, 1645, 1983)、Site-specific mutagenesis (部位特異的変異) 法 (Zoller, M. J. et al., Methods in Enzymol., 100, 468, 1983、Kunkel, T.A. et al., Methods in Enzymol., 154, 367-382, 1987)、PCR突然変異生成法、制限酵素処理と合成遺伝子の利用による方法等がある。

部位特異的変異法であれば、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版第1-3巻 Sambrook, J.ら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版New York 1989年に記載の部位特異的変異誘発法やPCR法などの方法を用い、本発明のDNA配列に変異を導入する。

これら方法により変異が導入されたDNA配列は、適当なベクターおよび宿主系を用いて、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual第2版第1-3巻

Sambrook, J.ら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press出版New York 1989年に記載の方法により、遺伝子工学的に発現させればよい。例えば、MutanTM - SuperExpress Km、MutanTM -K (宝酒造社製)、Quik Change Site- Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社製) といったキットが使用できる。

5

一般に、部位特異的変異法は、まず、タンパク質をコードするDNA配列をその配列中に含む一本鎖ベクターを得ることによって実施することができる。所望の突然変異した配列を持つオリゴヌクレオチドプライマーを、一般的には合成によって、例えばクレア等 (Crea, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 5765, 1978) の方法によって製造する。次に、このプライマーを一本鎖の本DNA配列含有ベクターとアニーリングし、大腸菌ポリメラーゼIクレノウフラグメントのようなDNA重合酵素を作用させて、突然変異含有鎖の合成を完成する。このようにして、第一の鎖は元の非突然変異配列をコードしており、第二の鎖は所望の突然変異を有しているヘテロ二本鎖が形成される。次いで、この二本鎖ベクターを用いて、
10 適当な細菌、または細胞を形質転換し、³²P-標識突然変異生成プライマーから成る放射性プローブへのハイブリダイゼーションを介してクローンを選択する (Wallace, R.B., Nucleic Acids Res., 9, 3647, 1981)。選択されたクローンには、突然変異した配列を有する組換えベクターを含んでいる。このようなクローンを選択した後、突然変異した本タンパク質の領域を形質転換に使用される型
15 の発現ベクターに入れることができる。

以降、(1)で示した組換えタンパク質の調整方法に従い、変異体を宿主細胞に産生させることができる。

PLA₂ 活性の測定

25 上記で得られた組換え体および変異体がPLA₂活性を有するか否かは、以下の判定方法に従う。

①組換え分泌型 PLA₂ タンパク質産生培養物と組換え分泌型 PLA₂ タンパク質を含

まないコントロール培養物を、 ^3H -オレイン酸で標識した大腸菌膜リン脂質画分と反応させる。

②遊離された ^3H -オレイン酸の量を、Elsbach らの方法(Methods Enzymol., 197, 24-31 (1991))に従い測定する。

- 5 ③ ^3H -オレイン酸の量を比較することにより、PLA₂ 活性の有無を判定する。

本発明タンパク質に対する抗体の調製

本発明のタンパク質に対する抗体は、以下の方法により作製される。

(1) ポリクローナル抗体の作製

- 10 推定されるアミノ酸配列の一部に基づいて通常のペプチド合成機で合成した合成ペプチドや、本タンパク質を発現するベクターで形質転換した細菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞、などにより産生されたタンパク質を通常のタンパク化学的方法で精製し、これらを免疫原とする。この免疫原を用いて、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H.D.ら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 New York 1989 年などに記載の方法に従って、適切な方法で動物を免疫することにより、抗原となるタンパク質を特異的に認識するポリクローナル抗体を容易に作製し、精製することができる。マウス、ラット、ハムスター、ウサギなどの動物を免疫し、その血清由来のポリクローナル抗体を作製すればよい。
- 15

20 (2) モノクローナル抗体

前述の免疫原で免疫したマウスやラットの脾臓またはリンパ節からリンパ球を取りだし、ミエローマ細胞と融合させて Kohler と Milstein の方法(Nature, 256, 495-497(1975))

- に従ってハイブリドーマを作製した後、該ハイブリドーマから単クローン抗体を
25 産生させ得る。例えば以下の工程により本タンパク質のモノクローナル抗体を得ることができる：

(a) タンパク質によるマウスの免疫、

- (b) 免疫マウスの脾臓の除去および脾臓細胞の分離、
- (c) 分離された脾臓細胞とマウスミエローマ細胞との融合促進剤（例えばポリエチレングリコール）の存在下での上記の Kohler らに記載の方法による融合、
- 5 (d) 未融合ミエローマ細胞が成長しない選択培地での得られたハイブリドーマ細胞の培養、
- (e) 酵素結合免疫吸着検定 (ELISA)、ウェスタンブロットなどの方法による所望の抗体を生産するハイブリドーマ細胞の選択および限定希釈法等によるクローニング、
- 10 (f) モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ細胞を培養し、モノクローナル抗体を収獲する。

分泌型 PLA₂ の測定キット及び分泌型 PLA₂ 関連疾患の診断薬

- 本発明においては、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体を用いて、
- 15 本発明タンパク質の測定を行なうことができる。本発明タンパク質に対する抗体を用いる測定法は被測定液中の抗原量（例えば、本発明タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作成した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競
- 20 合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法を用いることができる。

抗原または抗体の固相化に当たっては、また通常、タンパク質あるいは酵素等の固相化するのに用いられる化学的結合を用いることができる。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

- 25 サンドイッチ法においては、下記の工程により被測定液中の本発明タンパク質量を測定することができる。

(1) 固相化した本発明のモノクローナル抗体と被測定液を反応させ、標識化した別の本発明モノクローナル抗体を反応させる。

(2) 固相化担体上の標識剤の活性を測定する。

固相化抗体と標識化抗体は同一の抗体である必要はない。例えば、固相化抗体が本タンパク質の N 末端を認識する抗体であれば、標識化抗体は C 末端を認識する抗体を用いることができる。

標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質が用いられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{14}C などが用いられる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどが用いられる。

これら測定法によって、本タンパク質の濃度が過剰であった場合には、敗血症ショック、成人呼吸困難症候群、肺炎、外傷、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ等の疾病であると診断することができる。

従って、本発明の抗体は、このような診断を可能にする「診断薬」および「測定キット」を提供する。

また、本発明の抗体は、これら疾患の治療に有用である。従って、本発明の抗体は「治療薬」をも提供する。

PLA₁ 活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明において「スクリーニング方法」としては、例えば本発明のタンパク質を用いたハイ・スループット・スクリーニングが挙げられる。たとえば、Reynoldsらの方法 (Anal. Biochem. 204, 190-197 (1992)) に従って、96-穴プレート内に、試料とリン脂質基質 (racemic diheptanoyl thio-phosphatidylcholine) ならびに発色試薬 (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) を入れる。本タンパク質を加えて 40℃ で適当な時間インキュベートし、その吸光度 (OD:405 nm) の変化を測定する。試料を加えない場合での値と比較することにより、その試料の本分泌型

PLA₂に対する阻害活性を評価し得る。

スクリーニング方法により得られる化合物

- 分泌型 PLA₂ は、脂肪酸（例えば、アラキドン酸）の放出に関与している。過剰な脂肪酸の放出は、敗血症ショック、成人呼吸困難症候群、肺炎、外傷、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、慢性関節リウマチ等の疾病の原因となる。本発明のスクリーニング方法により得られる化合物は、分泌型 PLA₂ の活性を阻害する。従って、該化合物は、過剰な分泌型 PLA₂ の生産に起因する敗血症ショックなどの治療に有用である。
- 10 該化合物には、医薬的に許容される塩もまた包含される。かかる塩には、周知の方法により調整される、例えばナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、バリウム、アンモニウム等の無毒性アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩及びアンモニウム塩等が包含される。
- 15 該化合物の薬学的有効量を活性成分として、医薬製剤が調整される。該医薬製剤の投与単位形態としては、各種の形態が治療目的に応じて選択でき、その代表的なものとしては、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、顆粒剤、カプセル剤等の個体投与形態や、液剤、懸濁液剤、乳剤、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらは更に、投与経路に応じて経口剤、非経口剤、経鼻剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、軟膏剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形もしくは調製することができる。
- 20 上記医薬製剤の投与方法は、特に制限がなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等に応じて決定される。例えば、錠剤、丸剤、顆粒剤、カプセル剤等の個体投与形態や、液剤、懸濁液剤、乳剤は経口投与される。注射剤は単独又はブドウ糖やアミノ酸等の通常の補液と混合して静脈投与される。
- 25 更に注射剤は、必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。

上記医薬製剤中に含有されるべき本発明化合物の有効成分量およびその投与量は、特に限定されず、所望の治療効果、投与方法、治療期間、患者の年齢、性別その他の条件に応じて適宜選択される。一般的には、該投与量は、1日当たり体重1kg当たり、約1～10mg程度とするのがよく、該製剤は1日に1～数回に分けて投与することができる。

本発明の抗体は、本発明の分泌型 PLA₂ に特異的に結合することにより、本発明の分泌型 PLA₂ の PLA₂ 活性を阻害する。従って、本発明の抗体は、本発明のスクリーニング方法により得られる化合物と同様に、過剰な分泌型 PLA₂ の生産に起因する敗血症ショックなどの治療に有用である。

10

実施例

本発明を以下の実施例によりさらに説明する。

15

本発明の各工程において用いた一般的な実験手法（DNA のアガロースゲル電気泳動、ライゲーション反応、大腸菌の形質転換、DNA の制限酵素による消化、ノザン解析等）は Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al. Ed., John Wiley & Sons. Inc.) によった。DNA オリゴマーは国際試薬（株）より購入した。データの解析はソフトウェア開発（株）の GENETYX-SV/RC を用いて行った。また、DNA 配列の決定には常に複数のクローンの配列を解析し、PCR 反応中に起こる可能性ある misincorporation の影響を排除した。

20

配列表の配列番号 1 に、EST データベース中に検出された PLA₁ をコードすると考えられる cDNA 断片の配列を示す。この配列はあくまでも部分配列である。この断片が由来する遺伝子そのものと、その遺伝子がコードする蛋白質の機能を解析するためには、この断片から 5' 側および 3' 側につながる未同定の cDNA を単離すると同時にこの断片自身の配列を再確認する必要がある。全長 cDNA をクローニングするためには、その遺伝子の発現量の多い組織を材料に用いることが実験操

25

作上有利である。マウス各組織における発現量をノザン解析によって比較するためには、プローブとして用いる PLA₁ cDNA 断片を得る必要があるが、このような PLA₁ cDNA 断片はマウス組織由来の cDNA 試料を鋳型とする PCR によって単離することが可能である。

5

実施例 1 マウス新規 PLA₁ cDNA 断片の単離

配列番号 1 の DNA 配列をもとに配列番号 2 から 5 に示す短鎖 DNA オリゴマーを準備した。これらの DNA オリゴマーは図 1 に示すような位置関係にある。配列番号 2 と 3 のオリゴマーペアからは 319 塩基対、配列番号 4 と 5 のオリゴマーペアからは 315 塩基対の PLA₁ cDNA 断片が PCR によって増幅されると予想できる。さらに、初めに配列番号 2 と 3 のオリゴマーで増幅した産物を鋳型とし、続いて配列番号 4 と 5 のオリゴマーによる PCR を行えば、高い特異性と感度をもって PLA₁ cDNA を増幅することができると期待できる (Nested-PCR)。

15 まず、129/SvJ 系統のマウスの組織 (心臓、腎臓、肺) から抽出した mRNA を逆転写して cDNA 試料を調製した。この cDNA 試料を鋳型に、配列番号 2 と 3 のオリゴマーを用いて PCR を行った。酵素は宝酒造 (株) の TaKaRa Ex Taq を用い、反応組成は当酵素の使用説明書に従った。増幅装置は Perkin Elmer Cetus 社の Thermal Cycler を使用し、94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分を 30 サイクルで増幅を行なった。反応後、反応溶液の 1 μl を鋳型として配列番号 4 と 5 のオリゴマーで 2 回目の PCR を行なった。反応条件は 1 回目と同じである。PCR 反応液を 2% アガロースゲル電気泳動にかけ、増幅産物を分離した。その結果、調べたすべての臓器由来の cDNA から、予想されるサイズに DNA が増幅されていた。

25 この DNA 断片をゲルから切り出し、スベルコ社の GenElute Agarose spin column によって DNA の精製を行なった。この DNA を Invitrogen 社のベクター pCRII とライ

ゲーションし、ライゲーション液で大腸菌 DH5 α 株 (TOYOBO 社) を形質転換した。得られた組み換え大腸菌を培養し、プラスミド DNA を調製した (Promega 社の Wizard Plus Minipreps DNA Purification System)。ベクターに挿入されたインサート部分の塩基配列を Amersham Pharmacia Biotech 社の ALFred DNA Sequencer
5 によって解析した。その結果、配列番号 1 に示す配列に対応する配列からなる DNA が PCR によって増幅されていたことが明らかとなった。

実施例 2 マウス各組織における該分泌型 PLA₂ mRNA 発現パターンの解析

組織における発現の有無ならびに組織間での相対発現量は、各組織から抽出した mRNA を固定したシートを放射標識した DNA 断片 (プローブ) とハイブリダイゼーションすることによって確認することができる (ノザン解析)。実施例 1 で PCR 増幅後精製した DNA 断片を、Amersham Pharmacia Biotech 社の Megaprime DNA labeling system を用いて放射標識した。この断片をプローブとして Clontech 社のマウス Multiple tissue northern blot をハイブリダイゼーションした。適当
15 な濃度の塩を含む水溶液で洗浄後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、調べた臓器の中では心臓において該 PLA₂ mRNA が最も多く発現していることが判明した。

実施例 3 マウス分泌型 PLA₂ cDNA 全一次構造の決定

cDNA の既知部分 (中央部) の情報から cDNA の 5' 端 3' 端を含む上流下流部分は、以下のような方法によって単離することができる。既知部分の配列よりアンチセンスオリゴマーならびにセンスオリゴマーをいくつか用意する。cDNA 試料として、あらかじめその 5' 端 3' 端にある特定の配列からなるアダプター DNA が付加されているものを鋳型にして、この特定の配列に対応するオリゴマーと
25 PLA₂ 特異的なオリゴマーのペアで PCR を行うことによって、未知部分を含む cDNA を増幅することができる (RACE 法)。

cDNA 試料としては Clontech 社の Marathon-ready cDNA (Mouse spleen)を用いた。RACE 法に用いたオリゴマーを配列番号 6 から 9 に示す。このうち配列番号 6、7 は 5' 上流域を単離するためのアンチセンスオリゴマー、配列番号 8 と 9 は下流域を単離するためのセンスオリゴマーである。

5

RACE 法も中央部分の PCR 増幅と同様に Nested PCR で行なった。5' 側 RACE には、1 回目の PCR では配列番号 6 のオリゴマーと Clontech 社の cDNA 試料に添付のオリゴマー AP-1 を、2 回目の PCR には配列番号 7 のオリゴマーと cDNA 試料 (Clontech) 添付の AP-2 を用いた。3' 側 RACE には、1 回目には配列番号 8 のオリゴマーと AP-1、2 回目には配列番号 9 のオリゴマーと AP-2 を用いた。酵素は TaKaRa Ex Taq を使用し、1 回目は 94℃ 1 分、60℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクル、2 回目は 94℃ 1 分、62℃ 1 分、72℃ 2 分を同じく 30 サイクルで増幅を行った。PCR 後、電気泳動を行い増幅産物を分離した。その結果、5' 側 RACE からは約 450 塩基対、3' 側 RACE からは約 470 塩基対のバンドが検出された。これらの DNA を実施例 1 と同様にクローニングし、その塩基配列を PE Applied Biosystems 社の PRISM 310 Genetic Analyzer によって解析し、決定した。

ここまでの過程で、PLA₁ cDNA を上流域、中央部、下流域の 3 つの領域で部分的に単離した。これらの cDNA が連続した 1 つの cDNA として存在していることを確認する目的で、配列番号 10 から 13 に示すオリゴマーを準備し、Clontech 社の Marathon-ready cDNA (Mouse spleen)を鋳型に配列番号 10 と 12 のオリゴマーを用いて PCR を行った。反応後、反応溶液の 1 μ l を鋳型にしてオリゴマー 1 と 13 で 2 回目の PCR を行った。いずれも、酵素は TaKaRa Ex Taq を用い、94℃ 1 分、55℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクルで増幅を行った。先と同様に増幅された DNA をクローニングし、その塩基配列の決定を行った。決定された

cDNA の配列を配列番号 1 4 に、それによってコードされるアミノ酸配列を配列番号 1 5 に示す。

タンパク質をコードしている部分の配列から PLA₂ タンパク質のアミノ酸残基数は 1 4 2 であることがわかった。本タンパク質は、分泌型 PLA₂ ファミリー分子間で保存されている全ての構造的特徴 (PLA₂ 活性中心部位、Ca²⁺ 結合部位の配列、Cys 残基数) を保持していた。しかしながら、本タンパク質は、既知の分泌型 PLA₂ と異なる配列から構成されており、アミノ酸レベルでの相同性は、マウス IB 型と 35.8%、マウス IIA 型と 47.7%、マウス IIC 型と 38.0%、マウス IID 型と 41.8%、マウス V 型と 41.0%、マウス X 型と 35.8% であった。

実施例 4 ヒト分泌型 PLA₂ cDNA 全一次構造の決定

一般的に、マウスとヒトでは同じタイプの遺伝子の配列は互いに高い相同性を持つと期待できるが、コンセンサス配列に対応する cDNA 配列は、ヒト型 PLA₂ の cDNA 配列と特に相同性が高く、かつマウス PLA₂ 遺伝子の配列情報をもとにヒトの相同遺伝子をクローニングする場合に利用価値がもっとも高い領域と考えられる。また、実施例 3 で決定されたマウスの cDNA 配列は、IIA 型、IID 型との相同性が高いことが判明したので、対応するヒト分泌型 PLA₂ 遺伝子もヒト IIA 型、ヒト IID 型との相同性が高いと予測できる。以上の仮定のもとに、実施例 3 で決定されたマウスの cDNA 配列、ヒト IIA 型、ヒト IID 型のコンセンサス配列部分を基にして、以下の 2 つのオリゴマーを設計した。

配列番号 1 4 記載の 2 3 位の Tyr から 2 8 位の Gly までに対応する cDNA 配列をもとに、ヒト IIA 型、ヒト IID 型のそれぞれに対応する cDNA 配列も考慮して、配列番号 1 6 からなるオリゴマー (センスオリゴマー) を準備した。また配列番号 1 4 記載の 4 6 位の His から 5 2 位の Arg までに対応する配列番号 1 7 からなるオ

リゴマー（アンチセンスオリゴマー）も合わせて準備した。これらのオリゴマーを用いて PCR を行うことにより、IIA 型を含む IIA 型類似のヒト PLA₁ 遺伝子を、ヒト Genomic DNA から高い感度と特異性を持って単離することができた。PCR は 94℃ 1 分、50℃ 1 分、72℃ 2 分を 30 サイクルで、その他の条件は実施例 5 1 と同条件で行った。PCR の鋳型には BOEHRINGER MANNHEIM 社の Human Genomic DNA を用いた。その結果、それぞれ、約 800、350、300 塩基対からなる 3 種類の増幅産物が電気泳動上検出された。

これらの断片を実施例 1 に記したようにクローニングし、その塩基配列の決定を行った。その結果、約 800 塩基対の DNA 断片はヒト IIA 型 PLA₁、約 350 塩基対の DNA 断片はヒト IID 型 PLA₁ であることが判明した。これらの DNA 断片は同じ位置にイントロンの配列を 1 個所含んでいたため、新規 PLA₁ も、同じ位置にイントロンの配列を含むことが予想されうる。約 300 塩基対の DNA 断片の塩基配列を配列番号 18 に示す。この塩基配列は、IIA 型、IID 型 PLA₁ と同じ位置に 212 塩基対のイントロンと予想されうる配列（配列番号 18 の 58 位から 269 位）を含んでおり、エクソンと予想されうる配列と実施例 3 で決定されたマウスの cDNA 配列の対応する領域には、85.1% の相同性があった。従って、この断片が新規ヒト PLA₁ 遺伝子の一部であると予想できた。

20 得られた塩基配列を基にして、センスオリゴマー、アンチセンスオリゴマーをそれぞれ 3 個ずつ設計した。それらのオリゴマーの配列を配列番号 19 - 24 に記す。

発現量の多い組織を同定するために、これらのオリゴマーを使って種々の組織由来のヒト cDNA を鋳型として実施例 1 に記したのと同様に Nested-PCR を行った。すなわち、1 回目の PCR では、配列番号 19 と 22 のオリゴマーを用い、その増幅産物を鋳型として、2 回目の PCR には配列番号 20 と 23 のオリゴマーを用い

た。PCRは1回目、2回目とも、94℃1分、55℃1分、72℃1分を30サイクルで、その他の条件は実施例1と同条件で行った。1回目のPCRの鋳型には、Clontech社のMarathon-ready cDNA (Human kidney、pancreas、small intestine、spleen、lung、heart、leukocyte、liver)を用いた。その結果、用いた組織のうち最も多く新規ヒトPLA₁を発現しているのは、small intestineであると予想できた。得られたDNA断片は実施例1と同様にしてクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、前項において予想したとおりのエクソン領域からなるcDNA配列であることがわかった。

次に、5'端を含む上流部分をRACE法によって単離した。具体的な実験は、実施例3に記した条件で行い、PCRの鋳型にはClontech社のMarathon-ready PCR cDNA (Human Small Intestine)を用いた。上流域を単離するためのアンチセンスオリゴマーは、配列番号23と24を用いた。その結果、約120塩基対のDNA断片が得られ、塩基配列を決定した。その配列からさらに上流域を単離するためのアンチセンスオリゴマー2個(配列番号25、26)を設計し、同様にしてRACE法を行った。その結果、約150塩基対のDNA断片が得られ、塩基配列を決定した。

また、3'端を含む下流部分は以下のようなNested PCRによって単離した。すなわち、ここまでで得られた塩基配列から、該新規ヒトPLA₁は、対応するマウスとPLA₁との相同性が非常に高いことが判明したので、実施例3で決定されたマウスのcDNA配列(配列番号14)を基にして、595位から615位、601位から621位に対応するアンチセンスオリゴマー2個(配列番号27、28)を準備し、これらオリゴマーをアンチセンスプライマーに用いたPCRを行った。1回目のPCRでは、配列番号20と28のオリゴマーを用い、その増幅産物を鋳型として、2回目のPCRには配列番号21と27のオリゴマーを用いた。PCRは1回目、

2 回目とも、94℃1分、55℃1分、72℃2分を30サイクルで、その他の条件は実施例1と同条件で行った。1回目のPCRの鋳型には、Clontech社の Marathon-ready cDNA (Human small intestine) を用いた。その結果、約300塩基対のDNA断片が得られ、実施例1と同様にして塩基配列を決定した。

- 5 ここまでの過程でPLA₂ cDNAを、中央部、2個の上流域、下流域に分けて部分的に単離した。これらの塩基配列には連続性があり、それらを連結した配列を配列番号29に記す。

- タンパク質をコードしている部分の鎖長から、PLA₂蛋白質のアミノ酸残基数は
10 142であることがわかった。本タンパク質(配列番号30)は、分泌型PLA₂ファミリー分子間で保存されている全ての構造的特徴(PLA₂活性中心部位やCa²⁺結合部位の配列、Cys残基数)を保持していた。しかしながら、本タンパク質は、既知の分泌型PLA₂と異なる配列から構成されており、アミノ酸レベルでの相同性は、ヒトIB型と39.0%、ヒトIIA型と51.4%、ヒトIID型と39.2%、ヒトV型と
15 45.7%、ヒトX型と38.2%であった。

実施例5 組み換え型PLA₂の発現

- 得られたcDNA配列を基にしてオリゴマー(配列番号31—34)を準備し、cDNA配列のなかでアミノ酸をコードする部分(コーディング領域)を増幅するNested
20 PCRを行った。1回目のPCRには、配列番号31と33、2回目のPCRには配列番号32と34に示すオリゴマーを用い、鋳型にはClontech社のMarathon-ready PCR cDNA (Human Small Intestine)を用いた。配列番号32に示すオリゴマーは制限酵素NotIで認識される配列とmRNAからタンパク質への翻訳を促進する配列(Kozak sequence)を持ち、配列番号34に示すオリゴマーは制限酵素XbaIで認
25 識される配列を持つ。コーディング領域にはNotIとXbaIが認識する配列はない。従って、PCRで増幅されたcDNA断片をこれらの制限酵素で消化すると、コーディ

ング領域に対応する cDNA が翻訳開始点の上流に Kozak 配列を含み、さらに NotI と XbaI によって切断された切り口をそれぞれ上流側、下流側の末端にもつ cDNA として調製される。

- 5 PLA₂ 発現ベクターは、この cDNA を哺乳動物細胞用の発現ベクターである pcDNA 3.1(+) (Invitrogen 社)のプロモーター下流に順方向になるよう NotI、XbaI サイト間に挿入して作成した。プロモーターから PLA₂ cDNA にかけての塩基配列を再決定し、構築上人為的な変異が導入されていないことを確認した後、PLA₂ 発現ベクターをサル腎臓由来の培養細胞である COS-7 細胞に導入した。導入には、
- 10 BOEHRINGER MANNHEIM 社の FuGENE™6 トランスフェクション試薬を用い、方法は使用説明書に従った。導入 3 日後に、培養上清および細胞ライセート中の PLA₂ 活性を測定した。PLA₂ 活性の測定は、³H-オレイン酸で標識した大腸菌膜リン脂質画分を基質として、Elsbach らの方法 (Methods Enzymol. 197, 24-31 (1991)) の方法に従って行った。その結果、PLA₂ cDNA を挿入していないコントロールプラスミドを導入した細胞に比べて、有意に高い PLA₂ 活性が培養上清中に検出され、
- 15 分泌型 PLA₂ であることが確認された(図 2)。また、その酵素活性の発現には、高濃度の Ca²⁺が必須であった(図 3)。

実施例 6 PLA₂ 活性を阻害する化合物のスクリーニング

- 20 既に、IIA 型、IB 型分泌型 PLA₂ の酵素活性を強く抑制することが報告されている 1-oxamoylindolidine 誘導体の Indoxam (Yokota ら、Biochim. Biophys. Acta (1999) 1438, 213-222) のヒト新規分泌型 PLA₂ に対する阻害活性について調べた。PLA₂ 活性は、Draheim らの方法 (J. Med. Chem., (1996) 39, 5159-5175) に準じて、¹⁴C 標識 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC) からの ¹⁴C-オレ
- 25 イン酸の遊離量を測定することによって行なった。すなわち、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、200 mM NaCl、2 mM CaCl₂、1 mg/ml bovine serum albumin から成る溶液

中で、1 mM POPC (約 100,000 cpm の ^{14}C -POPC と非標識 POPC の混合物) と 3 mM デオキシコール酸から成る基質と各ヒト分泌型 PLA_2 を種々の濃度の Indoxam 存在下で、40°C、60 分間反応させ、遊離された ^{14}C -オレイン酸量を測定した。ヒト IB 型 (2 ng)、IIA 型 (10 ng) ならびに X 型 (4 ng) は、精製標準品を用いた。ヒト V 型、IID 型ならびに本発明の分泌型 PLA_2 (IIE 型) は、安定発現させた CHO 細胞から調製した培養上清を用いた。

Indoxam 非存在下での各ヒト分泌型 PLA_2 による ^{14}C -POPC からの ^{14}C -オレイン酸遊離量を 100% とし、それに対する Indoxam 各濃度下での遊離量を % で示した。この結果、Indoxam は、本発明のヒト PLA_2 (IIE 型)、IID 型および IIA 型を強く阻害することが確認された (図 4)。

産業上の利用可能性

本発明によれば、ヒト分泌型 PLA_2 ; ヒト分泌型 PLA_2 をコードする DNA ; 該 DNA を含む発現ベクター ; 該発現ベクターを有する形質転換体 ; 該形質転換体を用いたヒト分泌型 PLA_2 の製造方法が提供される。

本発明の分泌型 PLA_2 を用いることで、分泌型 PLA_2 が関与する疾病の解析手段を提供するとともに、本酵素を特異的に阻害する化合物の探索手段をも提供するものである。その抗体を用いた測定系は、種々の疾患の診断に応用することが可能である。

請求の範囲

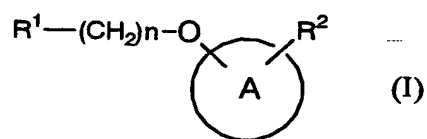
1. 配列番号 30 の 1 位の Asn から 1 2 3 位の Cys までのアミノ酸配列を含むタンパク質。
- 5 2. 配列番号 30 の - 1 9 位の Met から 1 2 3 位の Cys までのアミノ酸配列を含む請求項 1 記載のタンパク質。
3. 請求項 1 または 2 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または付加されたアミノ酸配列を含み、かつホスホリパーゼ A₁ 活性を有するタンパク質。
- 10 4. 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。
5. 配列番号 29 の 1 1 6 位の A から 4 8 4 位の C までの塩基配列を含む請求項 4 記載の DNA。
6. 配列番号 29 の 5 9 位の A から 4 8 4 位の C までの塩基配列を含む請求項 5 記載の DNA。
- 15 7. 請求項 5 または 6 に記載の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、ホスホリパーゼ A₁ 活性を有するタンパク質をコードする DNA。
8. 請求項 4 から 7 のいずれかに記載の DNA を有する発現ベクター。
9. 請求項 8 記載の発現ベクターを宿主に導入して得られる形質転換体。
10. 宿主が哺乳類細胞株である請求項 9 記載の形質転換体。
- 20 11. 請求項 9 または 10 に記載の形質転換体を培養する工程、および產生された請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質を培養培地から回収する工程を包含する、該タンパク質の製造方法。
12. 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質を特異的に認識する抗体。
- 25 13. 請求項 12 に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼ A₁ 関連疾患の診断薬。

1 4 . 請求項 1 2 に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼA₁の測定キット。

1 5 . 請求項 1 2 に記載の抗体を含有することを特徴とする分泌型ホスホリパーゼA₁関連疾患の治療薬。

5 1 6 . 請求項 1、2 または 3 のいずれかに記載のタンパク質を用いた、ホスホリパーゼA₁活性を特異的に阻害する化合物のスクリーニング方法。

1 7 . 請求項 1 6 に記載のスクリーニング方法より得られる一般式 (I)



(式中、

10 A環は、置換されていてもよい炭素環、又は置換されていてもよい複素環；

R¹は、-COOH、-SO₃H、又は-PO(OH)₂；

R²は、-COCONH₂、-CH₂CONH₂、又は-CH₂CONHNNH₂；

n は、0～6の整数)

で示される化合物を有効成分とするIIE型ホスホリパーゼA₂阻害剤。

15 1 8 . IIE型ホスホリパーゼA₂が請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質である請求項 1 7 記載の阻害剤。

図 1

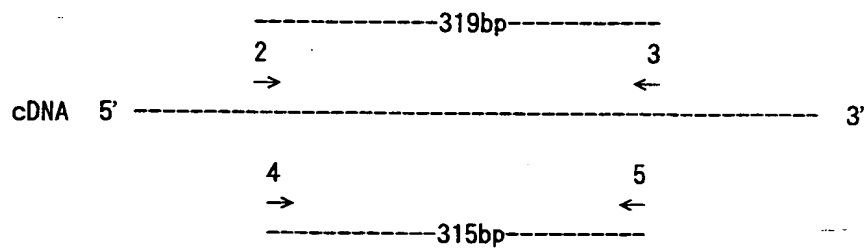
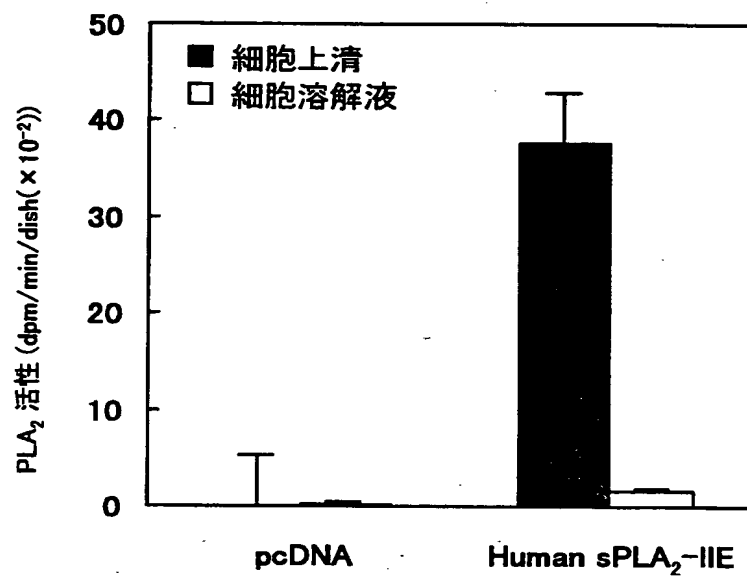


図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3

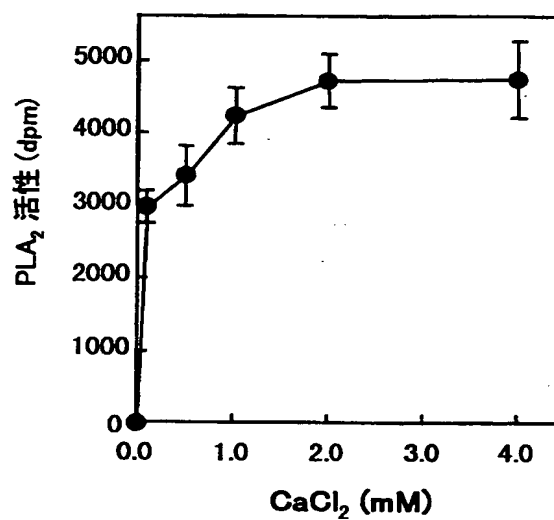
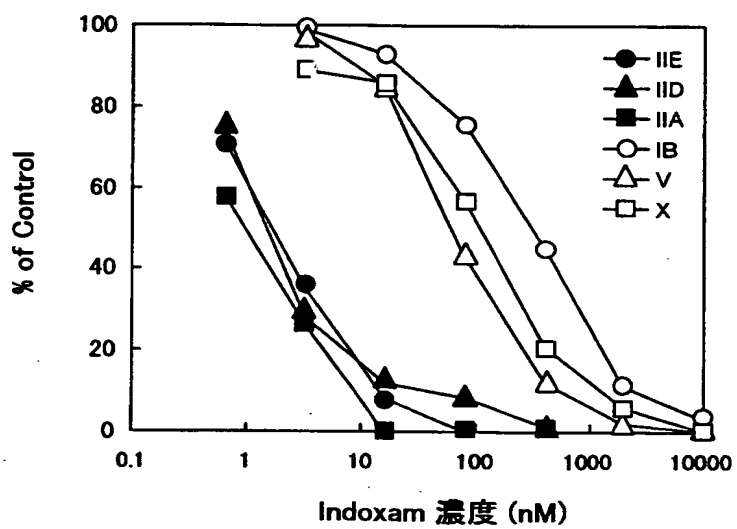


図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Shionogi & Co., LTD.

<120> A gene encoding novel human secretory type
phospholipase A2

<130> 51-06052W0

<150> JP 266616/1999

<151> 1999-09-21

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 320

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```

cttcaagaga ngagggaaac ctgocctgna gtacaatnac tatggctgct attgcggtgt 60
cggteggctcc cactggccag tgggacgaaa cggattgggt ttgtcatgcc catgactgct 120
gctatggccg cctggagaan ctgggctgtg accccaagct ggaaaagtac ctcttctcta 180
tcactcgaga caacatcttc tgtctggtta aaacggcttg ccagcggcat acctgcgaat 240
gtgacaaaaa accgtctctt gctttcgcca caacctgaac acttacaacc gcaantatgc 300
ccactacccc aacaagctgt

```

320

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

```

cttcaagaga ngagggaaac ctg

```

23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO,

<213> Artificial Sequence

<400> 3

agcttggttg ggtagtggc

20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tcaagagang agggaaacct gcc

23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

cttggtggg tagtggcat a

21

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggttgtaagt gttcaggtg tgg

23

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

acattcgag gtatgccgt g

21

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

agacaacatc ttctgtctg gt

22

THIS PAGE BLANK (OSP)

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 9
ttgccagcgg catacctgcg agt

23

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 10
aggtagaaaa gagacctctc tca

23

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 11
tagacgtga ctcagagctg ca

22

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 12
ggaaaataga cttctcttat tcag

24

<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<400> 13
agggtattga gatgccagag gc

22

<210> 14
<211> 883

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(591)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (223)..(591)

<400> 14

gaaaagagac ctctctcagt agacggtagc tcagagctgc aggtgtacc aggcaggtgg 60

actcggctcc catcaccttt gcaacagggc cagagcttgc agtaccaga tgccctggg 120

aggtggcaga gcaggtccc atgccccctg cctacctccc ccagg atg aaa cct ccc 177

Met Lys Pro Pro

att gcc ctg gct tgc ctt tgc ctc ctg gtg ccc ctg gct ggc ggg aac 225

Ile Ala Leu Ala Cys Leu Cys Leu Leu Val Pro Leu Ala Gly Gly Asn

-15 -10 -5 -1 1

ctg gtc cag ttt gga gtg atg att gag aga atg acg gga aag cct gcc 273

Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Arg Met Thr Gly Lys Pro Ala

5 10 15

ctg cag tac aat gac tat ggc tgc tat tgc ggt gtc ggt ggc tcc cac 321

Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Val Gly Gly Ser His

20 25 30

tgg cca gtg gac gag acg gat tgg tgt tgt cat gcc cat gac tgc tgc 369

Trp Pro Val Asp Glu Thr Asp Trp Cys Cys His Ala His Asp Cys Cys

35 40 45

tat ggc cgc ctg gag aag ctg ggc tgt gac ccc aag ctg gaa aag tac 417

Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Asp Pro Lys Leu Glu Lys Tyr

50 55 60 65

ctc ttc tct atc act cga gac aac atc ttc tgt gct ggt aga acg gct 465

Leu Phe Ser Ile Thr Arg Asp Asn Ile Phe Cys Ala Gly Arg Thr Ala

70 75 80

tgc cag cgg cat acc tgc gag tgt gac aag aga gct gct ctt tgc ttt 513

Cys Gln Arg His Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala Ala Leu Cys Phe

85 90 95

cgc cac aac ctg aac act tac aac cgc aag tat gcc cac tac ccc aac 561

Arg His Asn Leu Asn Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala His Tyr Pro Asn

THIS PAGE BLANK (USPTO)

100

105

110

aag ctg tgt act ggg ccc acc cca ccc tgc tgaggccctg ctcggctoca 611
 Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys

115

120

tagccacccc aggtgtgtgc agtctcaggc ccagagaagc tcggaaccca gattcctctc 671

ccagcagact catccgcgcc cccccccaga gatcatgagc cctggctctc ggctccagg 731

accacaccag atccacggga tcagctgaag aagtcacggg actcgtcagc gtcacaaga 791

tccactaagt cgctctggc atctcaatac cctctctga ataagagaag tctattttcc 851

cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

883

<210> 15

<211> 142

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Met Lys Pro Pro Ile Ala Leu Ala Cys Leu Cys Leu Leu Val Pro Leu

-15

-10

-5

Ala Gly Gly Asn Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Arg Met Thr

-1 1

5

10

Gly Lys Pro Ala Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Val

15

20

25

Gly Gly Ser His Trp Pro Val Asp Glu Thr Asp Trp Cys Cys His Ala

30

35

40

45

His Asp Cys Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Asp Pro Lys

50

55

60

Leu Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Ile Thr Arg Asp Asn Ile Phe Cys Ala

65

70

75

Gly Arg Thr Ala Cys Gln Arg His Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala

80

85

90

Ala Leu Cys Phe Arg His Asn Leu Asn Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala

95

100

105

His Tyr Pro Asn Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys

110

115

120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 16
 ctayggctgy yagtgyg 18

<210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 17
 ghyrctagca rcagtcatg 19

<210> 18
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 ctatggctgt tactgggca tgggtgctc ccactggcgc gtagaccaga ctgactggtg 60
 aggaagcagc ctgcaggggg acctccatgg gtagggagga gctgggggat cctgggagga 120
 tctggggaga aggaggggaag cctgggggca cctggaaaat tcaggctgat ctctctctg 180
 ggctactttg ggctcnggg ccccgagcag cccctggctc agccagcct ggctcacagg 240
 tccctccagg tcaacctga ccttgcagg tctgcccag ccacgactg ctgtacggg 300

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 19
 ctatggctgt tactgggca tc 22

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<400> 20

ggcatcggtg gctccactg g

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

tccactggc cggtagacca g

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

tagcagcagt cgtggcgtg g

21

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

tggcagcacc agtcagctctg

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

agtctggtcc accggcagc g

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

cccaaactga accaggttc c

21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 26
 ggttcccggt gaccagagcc a 21

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 27
 gctatggagc cgagcagggc c 21

<210> 28
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 28
 ggggtggcta tggagccgag c 21

<210> 29
 <211> 487
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (59)..(484)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (116)..(484)

<400> 29
 ctgctttctt ctgctgctt ttatgctcct tgtgcaoctc ccttccccgc aacctggg 58

atg aaa tct ccc cac gtg ctg gtg ttc ctt tgc ctc ctg gtg gct ctg 106
 Met Lys Ser Pro His Val Leu Val Phe Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu
 -15 -10 -5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gtc acc ggg aac ctg gtt cag ttt ggg gtg atg atc gag aag atg aca 154
 Val Thr Gly Asn Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Lys Met Thr
 -1 1 5 10

ggc aag tcc gcc ctg cag tac aac gac tat ggc tgt tac tgc ggc atc 202
 Gly Lys Ser Ala Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Ile
 15 20 25

ggt ggc tcc cac tgg ccg gtg gac cag act gac tgg tgc tgc cac gcc 250
 Gly Gly Ser His Trp Pro Val Asp Gln Thr Asp Trp Cys Cys His Ala
 30 35 40 45

cac gac tgc tgc tac ggg cgt ctg gag aag ctg ggc tgt gag ccc aaa 298
 His Asp Cys Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Glu Pro Lys
 50 55 60

ctg gaa aag tat ctt ttc tct gtc agc gaa cgt ggc att ttc tgc gcc 346
 Leu Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Val Ser Glu Arg Gly Ile Phe Cys Ala
 65 70 75

ggc agg acc acc tgc cag cgg ctg acc tgc gag tgt gac aag agg gct 394
 Gly Arg Thr Thr Cys Gln Arg Leu Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala
 80 85 90

gcc ctc tgc ttt cgc cgc aac ctg ggc acc tac aac cgc aaa tat gcc 442
 Ala Leu Cys Phe Arg Arg Asn Leu Gly Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala
 95 100 105

cat tat ccc aac aag ctg tgc acc ggg ccc acc ccg ccc tgc tga 487
 His Tyr Pro Asn Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys
 110 115 120

<210> 30

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Lys Ser Pro His Val Leu Val Phe Leu Cys Leu Leu Val Ala Leu
 -15 -10 -5

Val Thr Gly Asn Leu Val Gln Phe Gly Val Met Ile Glu Lys Met Thr
 -1 1 5 10

Gly Lys Ser Ala Leu Gln Tyr Asn Asp Tyr Gly Cys Tyr Cys Gly Ile
 15 20 25

Gly Gly Ser His Trp Pro Val Asp Gln Thr Asp Trp Cys Cys His Ala

THIS PAGE BLANK

| | | | |
|---|-----|-----|----|
| 30 | 35 | 40 | 45 |
| His Asp Cys Cys Tyr Gly Arg Leu Glu Lys Leu Gly Cys Glu Pro Lys | | | |
| 50 | 55 | 60 | |
| Leu Glu Lys Tyr Leu Phe Ser Val Ser Glu Arg Gly Ile Phe Cys Ala | | | |
| 65 | 70 | 75 | |
| Gly Arg Thr Thr Cys Gln Arg Leu Thr Cys Glu Cys Asp Lys Arg Ala | | | |
| 80 | 85 | 90 | |
| Ala Leu Cys Phe Arg Arg Asn Leu Gly Thr Tyr Asn Arg Lys Tyr Ala | | | |
| 95 | 100 | 105 | |
| His Tyr Pro Asn Lys Leu Cys Thr Gly Pro Thr Pro Pro Cys | | | |
| 110 | 115 | 120 | |

<210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 31
 atgaaatctc cccacgtgct gg 22

<210> 32
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 32
 agtagtgat gggcgccca ccatgaaatc tccccacgtg ctggtgttc 49

<210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<400> 33
 tcagcagggc ggggtggg 18

<210> 34
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 34

taagcttttc tagatcagca gggcgggtg ggcccgtgc acag

44

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N9/20, C12N15/55, C12P21/02, C12P21/08, C07K16/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N9/20, C12N15/55, C12P21/02, C12P21/08, C07K16/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | Balsinde J. et al. "Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2.", J Biol Chem., Vol.272, No.26 (1997), pp.16069-72 | 1-18 |
| A | Tischfield JA. et al., (A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals.", J Biol Chem., Vol.272, No.28 (1997), pp.17247-50 | 1-18 |

☐

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 December, 2000 (12.12.00)

Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 00/06344

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N9/20, C12N15/55, C12P21/02, C12P21/08, C07K16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N9/20, C12N15/55, C12P21/02, C12P21/08, C07K16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE, DDBJ/EMBL/GenBank/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A | Balsinde J. et al. "Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2." J Biol Chem. 第272巻, 第26号 (1997) p. 16069-72 | 1-18 |
| A | Tischfield JA. et al. "A reassessment of the low molecular weight phospholipase A2 gene family in mammals." J Biol Chem. 第272巻, 第28号 (1997) p. 17247-50 | 1-18 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 12. 00

国際調査報告の発送日

26. 12. 00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加藤 浩

印

4B

9050

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)